

# VU Research Portal

## Exosomes: The biological messengers

Balaj, L.

2012

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Balaj, L. (2012). *Exosomes: The biological messengers*. [PhD-Thesis – Research external, graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Samenvatting

Microvesicles (MVs) zijn nano-lipide blaasjes die door de meeste, zo niet alle, cellen worden uitgescheiden, zowel *in vivo* en *in vitro*. MVs worden fysiologisch vrijgegeven onder normale omstandigheden, maar de snelheid van afgifte is hoger onder pathologische omstandigheden, zoals in het geval bij tumorcellen. Eenmaal vrijgekomen, komen MVs uiteindelijk in de systemische circulatie terecht en kunnen worden geïsoleerd in bio-vloeistoffen, inclusief bloedplasma, bloedserum, cerebrospinale vloeistof, moedermelk, ascites, en urine. MVs vertegenwoordigen, tot op zekere hoogte, de RNA en eiwit status van de donorcellen vanuit welke de MVs worden vrijgegeven. MVs worden momenteel intensief onderzocht als een potentiële bron voor ziekte-gerelateerde biomarkers. In dit proefschrift worden de inhoud en functie van tumor MVs en hun toepasbaarheid als biomarker voor hersentumoren onderzocht, alsmede de rol van MVs als instrument voor gentransfer.

In Hoofdstuk 2 zijn verschillende MVs gekarakteriseerd, waaruit is gebleken dat tumorcellen een groter aantal MVs afscheiden dan normale humane fibroblasten. Dit is geanalyseerd door middel van NanoSight Tracking Analysis. Ook wordt aangetoond dat tumor MVs zijn verrijkt met retrotransposon elementen. De aanwezigheid van deze potentiële “besmettelijke” sequenties heeft geleid tot veel vragen over hun functie en het effect op cellen welke deze MVs ontvangen. Verder bleek dat het endogene retrovirus element HERV-K kan worden overgebracht van tumorcellen op normale HUVEC cellen en werd DNA (ssDNA of cDNA) gedetecteerd in tumor MVs. Bovendien correleerde dit goed met de reverse transcriptase activiteit in de corresponderende MVs. Al met al suggereert de data dat MVs een belangrijke rol spelen in de beïnvloeding van de omgeving van tumoren.

In **Hoofdstuk 3** is het gebruik van MVs voor het afleveren van adeno-geassocieerd virus (AAV) onderzocht voor een meer efficiënte gen transfer via AAV. Een deel van de AAV vectoren werd inderdaad geassocieerd met MVs (vexosomes genoemd). Gezien werd dat gentransfer via AAV1 en AAV2 vexosomes uiterst efficiënt verloopt in U87 en 293T cellen in kweek. De opname wordt bijna volledig geremd in de aanwezigheid van heparine wat suggereert dat MVs binden aan heparine op deze cellen. Ook wordt aangetoond dat de transfer afhankelijk is van de aanwezigheid van het AAV cap eiwit, aangezien deletie hiervan gen transfer volledig remde. Verder blijkt het mogelijk te zijn om vexosomes specifiek te richten naar een gewenste cel door deze een membraan-specifieke receptor tot expressie te laten brengen. Dus, MVs kunnen een nieuwe en spannende toepassing bieden om een meer efficiënte gentransfer via AAV mogelijk te maken.

In **Hoofdstuk 4** is onderzocht of circulerende MVs gebruikt kunnen worden om gen amplificatie in tumorcellen te detecteren. In eerste instantie is gekeken naar cMyc, welke vaak geamplificeerd is in medulloblastoma, een kinderhersentumor. Omdat serum monsters van kinderen bijzonder moeilijk te verkrijgen zijn, is deze hypothese onderzocht in muismodellen. Twee humane tumorcellijnen met amplificatie van het cMyc (D384), of het EGFR (A431) gen, werden subcutaan geïmplanteerd in immuun-gecompromitteerde muizen. De tumoren groeiden een maand, waarna bloed werd verzameld door cardiale punctie, de tumoren werden ontleed en de hoeveelheid humaan cMyc en humaan EGFR werd geanalyseerd in de circulerende serum MVs van deze muizen. Gen amplificatie in de primaire tumor werd inderdaad teruggevonden in circulerende MVs, wat de mogelijkheden van MVs als platvorm voor biomarkerontwikkeling onderstreept.

In **Hoofdstuk 5** is gekeken naar tumoreiwit biomarkers in MVs afkomstig uit serum. Een van de belangrijkste problemen bij het gebruik van MVs als bron voor tumor biomarkers is de aanwezigheid van niet mutante elementen. In deze studie gebruikten we target-specifieke magnetische nanodeeltjes in een verkleind nucleaire magnetisch resonantie systeem ( $\mu$ NMR), met een hogere detectie limiet dan FACS, Western blot, ELISA, en Nanosight. Dit systeem kan onderscheid maken tussen tumor-afkomstige en gastheercel-afkomstige MVs. Zo werd een moleculaire handtekening voor GBMs, en GBM-afkomstige MVs gevonden, en kon dit gebruikt worden om GBMs en de respons op therapie te bestuderen. Bij de behandeling met temozolomide (TMZ) bijvoorbeeld, verminderde het aantal cellen en MVs zoals gemeten met behulp van  $\mu$ NMR, terwijl metingen met FACS en WB geen veranderingen aangaven. Deze studie biedt een interessant mogelijkheid voor het gebruik van circulerende MVs als bron van tumor-gerelateerde eiwitten en de eenvoudige toepassing zou goed bruikbaar kunnen zijn in een point-of-care setting.

In **Hoofdstuk 6** hebben we mRNA-microarray data geanalyseerd van MVs afkomstig uit serum van negen GBM patienten en zeven gezonde donoren. Getracht werd nieuwe tumor biomarkers op RNA niveau te identificeren, om zo tot een expressie profiel te komen die nuttig zou kunnen zijn om GBMs te bestuderen. MVs van GBM patiënten konden duidelijk worden gescheiden van MVs van gezonde donoren., bovendien kwamen aanzienlijk meer genen verhoogd tot expressie dan verlaagd tot expressie (121 en 24 respectievelijk) in de MVs van GBM patiënten in vergelijking met de controles. Dit biedt de mogelijkheid voor het sequentieel vervolgen van de moleculaire signatuur van een GBM

In **Hoofdstuk 7** is de BEAMing PCR methode gebruikt om mutant IDH1 te detecteren in MV RNA. Mutaties in het *IDH1* gen zijn te vinden in 80% van graad II- graad III gliomas en secundaire GBMs. Er zijn aanwijzingen dat IDH1 mutaties voornamelijk optreden in proneurale gliomen, waardoor het mogelijk is deze tumoren te onderscheiden van de klassieke, de neurale en de mesenchymale subtypes. Bovendien heeft een *IDH1* mutatie ook mogelijk invloed op de prognose. BEAMing PCR is een zeer gevoelige assay welke mutaties kan detecteren met een zeer hoge gevoeligheid. Als bron van MVs is CSF en serum gebruikt. De mutant *IDH1* kon met hoge specificiteit en sensitiviteit in CSF van GBM patiënten worden gedetecteerd, maar niet in serum. Deze techniek biedt een grote mogelijkheid om mutaties in hersentumoren te detecteren, evenals puntmutaties die vaak moeilijk op te sporen zijn met andere technieken.

In **Hoofdstuk 8** is gekeken naar een andere bron van biomarkers in het bloed, namelijk de bloedplaatjes. Aangetoond werd dat tumorcellen specifieke cargo doorgeven aan bloedplaatjes zowel *in vitro* als *in vivo*. Deze cargo kan vervolgens uit de bloedplaatjes geïsoleerd worden voor biomarker analyse. Genexpressie analyse van GBM patient-afkomstige bloedplaatjes tonen een unieke RNA handtekening aan in vergelijking met gezonde controles. Kankerpatient-afkomstige MVs bevatten tumor biomarkers zoals EGFRvIII in glioblastomen en PCA-3 in prostaat kanker. Circulerende MVs blijken efficiënt opgenomen te worden door bloedplaatjes en hierdoor was het ook mogelijk EGFRvIII en PCA3 in bloedplaatjes terug te vinden. Dit suggereert dat het isoleren van bloedplaatjes vergelijkbare biomarker sensitiviteit en specificiteit zou kunnen hebben als circulerende MVs.

In **Hoofdstuk 9** zijn de fysische eigenschappen van biovloeistoffen bestudeerd om de kenmerken te identificeren waar rekening mee gehouden moet worden bij het isoleren van biovloeistof-afkomstige MVs. De hypothese was dat verschil in vloeistof viscositeit

een effect heeft op de sedimentatie efficiëntie van MVs tijdens ultracentrifugatie. De Viscositeit varieert tussen de verschillende biovloeistoffen en is het hoogst bij 4°C, en kan zo een belangrijke impact hebben op het isoleren van MVs uit verschillende biovloeistoffen zoals plasma, serum, urine en CSF. Het bleek dat serum, welke de hoogste viscositeit heeft, inderdaad correleert met de laagste sedimentatie efficiëntie, gevolgd door plasma, geconditioneerd media en CSF. Deze data ondersteunen dat protocollen goed gestandaardiseerd moeten worden voordat MV data van verschillende biovloeistoffen vergeleken kan worden, aangezien de proportie MVs onderschat ofwel overschat kan worden tussen de verschillende biovloeistoffen.

In **Hoofdstuk 10** worden de bevindingen besproken en in perspectief met de huidige literatuur gezet. De mogelijke richtingen van toekomstig werk komen aan de orde.